

供 药 学 类 专 业 使 用



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

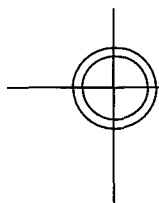
新世纪全国高等中医药院校教材



微生物学实验

主 编 罗 晶 袁嘉丽

中国中医药出版社



普通高等教育“十一五”国家级规划教材
新世纪全国高等中医药院校教材

微生物学实验

(供药学类专业使用)

主 编 罗 晶 (长春中医药大学)
袁嘉丽 (云南中医学院)
副主编 刘永琦 (甘肃中医学院)
刘燕明 (天津中医药大学)

中国中医药出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学实验/罗晶,袁嘉丽主编. —北京:中国中医药出版社, 2007. 1

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

ISBN 978 - 7 - 80156 - 701 - 7

I. 微... II. ①罗... ②袁... III. 微生物学 - 实验 - 高等学校 - 教材

IV. Q93 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 004338 号

中国中医药出版社出版
北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层
邮政编码: 100013
传真: 64405750
河北欣航测绘院印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 850 × 1168 1/16 印张 8 字数 182 千字
2007 年 1 月第 1 版 2007 年 1 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978 - 7 - 80156 - 701 - 7 册数 4000

*

定价: 10.00 元

网址 www.cptcm.com

如有质量问题请与本社出版部调换

版权专有 侵权必究

社长热线 010 64405720

读者服务部电话 010 64065415 010 84042153

书店网址 csln.net/qksd/

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
新世纪全国高等中医药院校教材

《微生物学实验》编委会

- 主 编 罗 晶 (长春中医药大学)
袁嘉丽 (云南中医学院)
- 副主编 刘永琦 (甘肃中医学院)
刘燕明 (天津中医药大学)
- 编 委 (以姓氏笔画为序)
万红娇 (江西中医学院)
马 萍 (成都中医药大学)
马秀敏 (新疆医科大学)
王 易 (上海中医药大学)
王雅贤 (黑龙江中医药大学)
叶荷平 (江西中医学院)
田维毅 (贵阳中医学院)
刘永琦 (甘肃中医学院)
刘燕明 (天津中医药大学)
范 虹 (湖北中医学院)
罗 晶 (长春中医药大学)
姜 欣 (辽宁中医药大学)
席孝贤 (陕西中医学院)
袁嘉丽 (云南中医学院)
顾红缨 (长春中医药大学)
黄琪珍 (云南中医学院)
程惠娟 (安徽中医学院)

编写说明

《微生物学实验》是普通高等教育“十一五”国家级规划教材《微生物学》的配套教材。微生物学是现代生物医学的重要学科，微生物学技术作为基础研究手段之一，具有很强的应用性。实验课教学不仅可以帮助学生理解和巩固所学的理论知识，而且可以培养学生的操作技能和分析问题、解决问题的能力及严谨的科学态度。

本教材内容分三篇，第一篇为基本技能实验，主要介绍微生物学常用实验技术，突出重基础的原则。第二篇为应用性实验，主要介绍药学专业常用的、与微生物学有关的实验技术，体现教学内容的针对性。第三篇为其他药学相关技术简介，此部分为选择性实验，目的在于拓宽学生的知识空间。教材后附有常用玻璃器皿及玻片清洁法、常用实验动物及基本技术、常用培养基的配制、常用染色液及试剂的制备等。各院校可根据不同专业、不同层次具体情况选择使用。

本教材的特点主要体现在：①科学实用性，在充分体现“三基”（基础理论、基本知识和基本技能）的基础上，注重教材内容与药学专业知识的融合；②先进性，尽量反映本学科最新信息、最新成果和最新技术；③可扩展性，教材内容的安排具有一定的弹性，将为教师和学生教与学提供更多的拓展空间。

本书适用于医药院校药学类各专业本科生、研究生的微生物学实验教学；也可供药学专业教师及科研人员参考。

由于编写时间仓促，编者水平有限，书中难免有不妥或错误之处，恳请读者和同道们提出宝贵意见，以便再版时修订。

编 者
2006 年 12 月

目 录

实验目的及实验室规则	(1)
------------------	-----

第一篇 基本技能实验

第一章 显微镜技术	(3)
一、普通光学显微镜	(3)
二、暗视野显微镜	(5)
三、荧光显微镜	(6)
四、相差显微镜	(6)
五、电子显微镜	(7)
第二章 微生物的形态学检测	(9)
实验一 细菌的革兰染色	(9)
实验二 细菌的鞭毛染色	(10)
实验三 细菌的芽胞、荚膜染色	(12)
实验四 支原体、衣原体的形态观察	(15)
实验五 放线菌的检测法	(16)
实验六 真菌形态及培养物观察	(17)
实验七 病毒的形态及包涵体	(18)
实验八 流感病毒的血球凝集试验	(18)
第三章 微生物的人工培养	(20)
实验九 常用培养基的制备	(20)
实验十 微生物接种技术	(21)
实验十一 细菌生长现象的观察	(24)
实验十二 病毒鸡胚培养法	(26)
第四章 微生物鉴定技术	(29)
实验十三 糖发酵试验	(29)
实验十四 IMViC 试验	(30)
实验十五 明胶液化试验	(32)
实验十六 硫化氢试验	(33)
实验十七 尿素酶试验	(34)
实验十八 血浆凝固酶试验	(35)
第五章 血清学实验	(36)

2 · 微生物学实验 ·	
--------------	-------

实验十九 凝集反应	(36)
实验二十 沉淀反应	(38)
实验二十一 巨噬细胞吞噬试验	(41)

第二篇 应用性实验

第六章 微生物的药物敏感试验	(43)
实验二十二 纸片法	(43)
实验二十三 MIC 测定	(44)
实验二十四 细菌的耐药性变异试验	(45)
实验二十五 连续稀释法	(47)
实验二十六 扩散法	(48)
实验二十七 熏蒸法	(49)
实验二十八 TTC 快速药物试验	(50)
实验二十九 中药抗结核分枝杆菌试验	(51)
实验三十 中药抗真菌试验	(52)
实验三十一 病毒嗜斑检测	(53)
第七章 药物的微生物学检查方法	(54)
实验三十二 注射药物的无菌检查	(54)
实验三十三 细菌总数的测定	(55)
实验三十四 大肠埃希菌的检测	(56)
实验三十五 霉菌总数检测	(57)
实验三十六 铜绿假单胞菌的检测	(58)
实验三十七 金黄色葡萄球菌的检测	(59)
实验三十八 破伤风梭菌检测	(60)
实验三十九 活螨检测	(61)
实验四十 热原检测	(64)
实验四十一 细菌内毒素检测(鲎试验)	(65)
实验四十二 荧光抗体(直接法)检测药物污染沙门菌	(67)
实验四十三 ELISA 法检测药物黄曲霉毒素	(68)
第八章 微生物菌种的保藏	(70)
实验四十四 菌种的纯化与保藏	(70)

第三篇 其他药学相关技术简介

第九章 分子微生物学技术	(73)
实验四十五 细菌 DNA 的提取	(73)

实验四十六 质粒 DNA 的提取	(74)
实验四十七 DNA 重组技术	(77)
实验四十八 聚合酶链式反应技术	(78)
第十章 色谱技术	(81)
一、高效液相色谱法	(81)
二、气相色谱法	(83)
三、薄层色谱法	(83)
四、离子色谱法	(84)
五、高效毛细管电泳	(84)
六、超临界流体色谱法	(85)
七、高速逆流色谱法	(85)
八、凝胶色谱法	(86)
第十一章 消毒与灭菌常用方法及设备	(87)
一、干热灭菌	(87)
二、湿热灭菌	(87)
三、紫外线杀菌	(90)
四、过滤除菌	(91)
第十二章 GMP 的微生物检测技术	(96)
一、空气洁净度标准	(96)
二、空气洁净度的检测方法	(97)
附录 1 常用玻璃器皿及玻片洗涤法	(100)
一、玻片洗涤法	(100)
二、玻璃器皿洗涤法	(100)
三、洗液的配制	(101)
附录 2 常用实验动物及基本技术	(102)
一、实验常用动物	(102)
二、实验动物注射方法	(102)
三、实验动物采血方法	(103)
附录 3 常用培养基的配制	(104)
一、营养肉汤培养基	(104)
二、营养琼脂培养基	(104)
三、伊红美兰(EMB)培养基	(104)
四、SS-琼脂培养基	(105)
五、双糖含铁培养基	(105)
六、硫乙醇酸钠培养基	(105)
七、沙氏培养基	(106)
八、改良马丁琼脂培养基	(106)

4 · 微生物学实验 ·	
九、胆盐乳糖增菌培养基	(106)
十、枸橼酸盐培养基	(107)
十一、磷酸盐葡萄糖蛋白胨水培养基	(107)
十二、蛋白胨水培养基	(107)
十三、乳糖发酵培养基	(107)
十四、明胶十六烷三甲基溴化铵琼脂培养基	(108)
十五、卵黄高盐琼脂培养基	(108)
附录4 常用染色液及试剂的制备	(109)
一、常用染色液的配制	(109)
二、常用试剂的配制	(110)
主要参考书目	(115)

实验目的及实验室规则

一、实验目的

1. 加深对微生物学理论知识的理解。
2. 培养学生观察、思考、分析、解决问题的能力以及动手操作能力。
3. 培养学生严肃的工作态度，严密的科学实验方法和严谨的工作作风。
4. 让学生掌握微生物学常用实验方法和基本操作技术。

二、实验室规则

在微生物学实验中，经常会接触到具有传染性的材料，如果在实验中稍有不慎，就有发生感染的危险，同时实验结果也容易受环境因素影响。因此，要求同学们严格遵守实验室规则，以保证安全并得到正确的实验结果。

1. 进入实验室必须穿工作服，不必要的物品不可携入室内。
2. 要保持室内安静，实验室内禁止吸烟、饮食。
3. 认真遵守操作规程。
4. 实验过程中如发生意外，应立即报告老师处理。如传染性材料污染地面，可用3%来苏水消毒30分钟；污染手部应把手浸入2%来苏水中5~10分钟。
5. 在实验过程中，要爱护器材，节约实验材料。
6. 实验结束后，要清理桌面及环境。将用过的器材放回原处或指定地点，按要求处理污染物及废弃物，室内物品未经允许不得带出室外。
7. 注意安全检查，值日生应尽职尽责清理卫生，检查水、电、煤气及门窗是否关好，用2%来苏水洗手后离开实验室。

第一篇

基本技能实验

第一章

显微镜技术

显微镜是观察微小物体用的光学仪器。至今已经有 300 多年的历史了。在医学方面，显微镜主要用来观察眼睛不能直接看见的组织细胞和微生物，故常将其称为生物显微镜。显微镜种类较多，在此仅介绍在微生物形态学研究中使用的普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜和电子显微镜。

一、普通光学显微镜

普通光学显微镜是一种精密的光学仪器。能将物体放大 40 ~ 1600 倍。

1. 构造 普通光学显微镜的构造可分为两大部分：即机械装置和光学系统。

(1) 机械装置：显微镜的机械装置包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗调螺旋和微调螺旋等部件。

①镜座：镜座是显微镜的基本支架，由底座和镜臂两部分组成。在其上部连接有载物台和镜筒，是用于安装光学放大系统部件的基础。

②镜筒：镜筒上接目镜，下接转换器，形成接目镜与接物镜（装在转换器下）间的暗室。

③物镜转换器：物镜转换器上可安装 3 ~ 4 个接物镜（4 ×、10 ×、40 ×、100 ×）。

④载物台：载物台中央有一孔，为光线通路。在台上装有弹簧标本夹和推动器，其作用为固定或移动标本的位置，使得镜检对象恰好位于视野中心。

⑤推动器：是移动标本的机械装置，它是由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成的，好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺，构成很精密的平面坐标系。

⑥粗调螺旋：粗调螺旋用于粗放地调节物镜和标本的距离。

⑦微调螺旋：用粗调螺旋只能粗放地调节焦距，难于观察到清晰的物像，因而需要用微调螺旋做进一步调节。

(2) 光学系统: 显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、接物镜、接目镜等组成, 光学系统使物体放大, 形成物体放大像。

①反光镜: 用自然光检视物体的普通光学显微镜, 在镜座上装有反光镜。反光镜是由一平面和另一凹面的镜子组成, 可以将投射在它上面的光线反射到聚光器透镜的中央, 照明标本。不用聚光器时用凹面镜, 凹面镜能起聚光线的作用。用聚光器时, 一般都用平面镜。目前使用的显微镜大都自带光源系统, 可通过调节电流大小调节光照强度。不需反光镜。

②聚光器: 位于载物台下面, 是由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成。聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器。

③物镜: 安装在镜筒前端转换器上的物镜利用入射光线时被检物像进行第一次造像, 物镜成像的质量对分辨力有着决定性的影响。

④目镜: 目镜的作用是把物镜放大的实像进行第二次放大, 并把物像映入观察者的眼中。目镜的结构较物镜简单, 普通光学显微镜的目镜通常由两组透镜组成, 上端的一组透镜又称为“接目镜”, 下端的则称为“场镜”。上下透镜之间或在两组透镜的下方, 装有由金属制的环状光阑或叫“视场光阑”, 物镜放大后的中间像就落在视场光阑平面处, 所以其上可安置目镜测微尺。

2. 成像原理 显微镜的放大是通过透镜来完成的, 单透镜成像具有像差和色差, 影响物像质量。由单透镜组合而成的透镜组相当于一个凸透镜, 放大作用更好, 可消除或部分消除像差或色差。

3. 使用操作及注意事项 显微镜结构精密, 使用时要严格按操作规程进行:

(1) 观察前的准备

①显微镜从显微镜柜或镜箱内拿出时, 要用右手紧握镜臂, 左手托住镜座, 平稳地将显微镜搬运到实验桌上。

②将显微镜放在自己身体的左前方, 离桌子边缘约 10cm 左右, 右侧可放记录本或绘图纸。

③调节光照。不带光源的显微镜, 可利用灯光或自然光通过反光镜来调节光照, 但不能用直射阳光, 直射阳光会影响物像的清晰并刺激眼睛。

④将 $10\times$ 物镜转入光孔, 将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置, 用左眼观察目镜中视野的亮度, 转动反光镜, 使视野的光照达到最明亮、最均匀为止。光线较强时, 用平面反光镜; 光线较弱时, 用凹面反光镜。自带光源的显微镜, 可通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

⑤调节光轴中心。显微镜在观察时, 其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一直线上。

(2) 低倍镜观察: 多数镜检标本都要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大, 易于发现目标和确定检查的位置 (但观察微生物除外)。

(3) 高倍镜观察: 在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好的显微镜, 低倍、高倍镜头是同焦的, 在正常情况下, 高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。

4. 油镜的使用 在微生物学实验中最常使用的是普通光学显微镜的油镜。油镜镜头透

镜很小,进入镜筒的光线很少,使用时为了增加亮度,必须在标本玻片与镜头之间,滴加与载玻片折光率相似的香柏油,使通过聚光器进入载玻片的光线不会因折射而散失,使视野明亮,物象清楚(图1-1)。使用油镜的操作步骤:

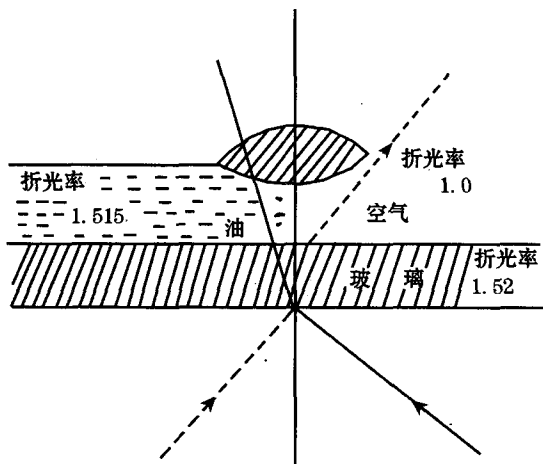


图1-1 油镜头使用原理示意图

- (1) 坐姿:端坐于实验台前,将显微镜直立放置,以免镜油流掉影响观察或造成污染。
- (2) 识别油镜头:油镜头上一般刻有“ $\times 100$ ”,“Oil”,“Hi”等标记。
- (3) 对光:用低倍镜对光,检查染色标本时光线宜强,要抬高聚光器,放大光圈,取得最大亮度。
- (4) 滴加香柏油:将标本放在载物台上固定好,滴加香柏油二滴,换油镜检查。
- (5) 调焦距:将油镜镜头移至中央对准标本,从侧面注视镜头,并缓慢向下转动粗螺旋,使镜筒下降,直至镜头浸于香柏油中并几乎接触到标本为止。然后将视线移至目镜,一面观察一面向上慢慢转动粗螺旋,待看到模糊的物象时,改用细螺旋直至看清物象。
- (6) 清洁保养:镜检完毕,将镜筒升起,取出标本片,用镜纸将镜头上的油擦干净。若油已干,可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦去油迹,再用擦镜纸揩去二甲苯。然后,将聚光器降下,各物镜呈八字形,放入镜箱内。

二、暗视野显微镜

暗视野显微镜与普通显微镜的主要区别是照明方式不同。它用强而窄的斜射光束照射标本,而又不让光束进入物镜。在没有光进入物镜时,视场是黑暗的,故叫暗视场显微镜。但由于标本中的微粒受光照射后能够散射光线,当散射光线进入物镜时,在显微镜中能够看到微粒的散射光点,好像微粒本身在发光一样。正如在一间较暗的室内,从墙上的小孔中射入一束强烈的阳光,我们在光路上能够看见灰尘的存在一样。这种现象,在光学上被称为丁道尔现象。暗视场显微镜就是根据这一原理设计的。

通过特殊的暗视野聚光器,使照明光线改变途径,不直接进入物镜,而是倾斜地照射到样品上,由样品表面的绕射光线入射到物镜内,产生样品的衍射图像。暗视场显微镜能够观

观察到 $0.004\mu\text{m}$ 以上的微粒存在。普通显微镜看不见的微粒，它可以看见。但它只能看到物体的外表轮廓和运动状态，而不能辨认其内部结构。

从结构上看，只需将普通显微镜更换上一个暗视场聚光器即可变为暗视野显微镜。常用的暗视野显微镜有抛物面形和心形两种。暗视野显微镜要在光线尽量暗的环境下观察（图 1-2）。

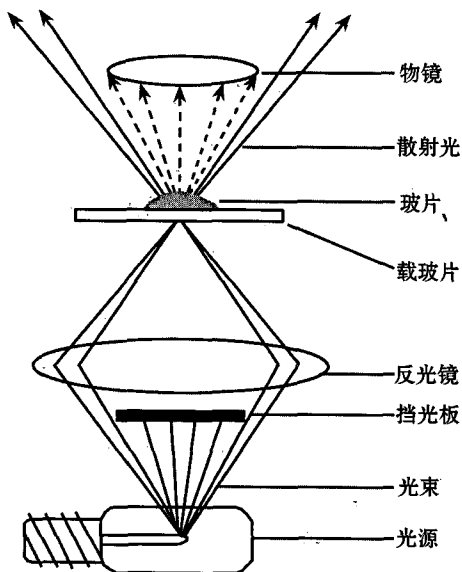


图 1-2 暗视野显微镜光路原理示意图

三、荧光显微镜

荧光显微镜是一种较为常用的光学显微镜，其基本原理是利用一定波长的激发光对样品进行激发，使之产生一定波长的荧光，从而用于对样品结构或其组分进行定性、定位、定量观察检测。其优点有：检出能力高；对细胞的刺激小；能进行多重染色。用途是：物体构造的观察；荧光的有无、色调比较进行物质判别；激发荧光量的测定对物质进行定性、定量分析。

荧光显微镜技术在生命科学研究中的应用：①对细胞结构或组分的定性、定位、半定量研究；②作为生物大分子筛选与鉴定的标记物。

注意事项：荧光显微镜要在光线尽量暗的环境下观察；使用荧光显微镜时要注意不要直接观察激发光源，保护眼睛。

四、相差显微镜

1. 相差显微镜的特点 相差显微镜是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差（即相位差）转化为光强差的特种显微镜。

光线通过比较透明的标本时，光的波长（颜色）和振幅（亮度）都没有明显的变化。

因此,用普通光学显微镜观察未经染色的标本(如活的细胞)时,其形态和内部结构往往难以分辨。然而,由于细胞各部分的折射率和厚度的不同,光线通过这种标本时,直射光和衍射光的光程就会有差别。随着光程的增加或减少,加快或落后的光波的相位会发生改变(产生相位差)。

一般人的肉眼感觉不到光的相位差,但相差显微镜能通过其特殊装置——环状光阑和相板,利用光的干涉现象,将光的相位差转变为人眼可以察觉的振幅差(明暗差),从而使原来透明的物体表现出明显的明暗差异,对比度增强,使我们能比较清楚地观察到普通光学显微镜和暗视野显微镜下都看不到或看不清的活细胞及细胞内的某些细微结构。

2. 结构和装置 相差显微镜与普通光学显微镜的基本结构是相同的,所不同的是它具有四部分特殊结构:即环状光阑、相板、合轴调节望远镜及绿色滤光片。

3. 使用范围、操作步骤及注意事项

(1) 使用范围:相差显微镜能观察到透明样品的细节,适用于对活体细胞生活状态下的生长、运动、增殖情况及细微结构的观察。

(2) 操作步骤:根据观察标本的性质及要求,挑选适合的相差物镜。将标本片放到载物台上,进行光轴中心的调整,取下一侧目镜,换上合轴调节望远镜,调整环状光阑与相板上的共轭面圆环完全重叠吻合,然后取下合轴调节望远镜,换回目镜。在使用中,如需要更换物镜倍数时,必须重新进行环状光阑与相板共轭面圆环吻合的调整。放上绿色滤光片,即可进行镜检,镜检操作与普通光学显微镜方法相同。

(3) 注意事项:视场光阑与聚光器的孔径光阑必须全部开大,而且光源要强;不同型号的光学部件不能互换使用;载玻片、盖玻片的厚度应遵循标准,不能过薄或过厚;切片不能太厚,一般以 $5 \sim 10\mu\text{m}$ 为宜,否则会引起其他光学现象,影响成像质量。

五、电子显微镜

电子显微镜由于使用了波长比可见光短得多的电子束作为光源,使其所能达到的分辨率较光学显微镜大大提高。根据电子束作用于样品的方式的不同及成像原理的差异,现代电子显微镜已发展形成了许多种类型,目前最常用的是透射电子显微镜(transmission electron microscope)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope)。

透射电子显微镜是在真空条件下,电子束经高压加速后,穿透样品时形成散射电子和透射电子,它们在电磁透镜的作用下在荧光屏上成像,放大倍数可达百万倍。扫描电子显微镜利用二次电子信号成像来观察样品的表面形态。电子“探针”扫描,激发样品表面放出二次电子,探测器收集二次电子成像,放大倍数可在 $20 \sim 3000000$ 倍之间变化。

表 1-1 电子显微镜与光学显微镜的主要区别

显微镜	分辨本领	光源	透镜	真空	成像原理
光学显微镜	200nm	可见光 (400 ~ 700nm)	玻璃透镜	不要求真空	利用样品对光的吸收形成明暗反差和颜色变化
	100nm	紫外光 (约 200nm)	玻璃透镜	不要求真空	
电子显微镜	0.1nm	电子束 (0.01 ~ 0.9nm)	电磁透镜	要求真空 $1.33 \times 10^{-5} \sim 1.33 \times 10^{-3} \text{Pa}$	利用样品对电子的散射和透射形成明暗反差

目前主要电镜制样技术有：①超薄切片技术，用于电镜观察的样本制备；②负染色技术 (negative staining)，染色背景，衬托出样品的精细结构；③冰冻蚀刻技术 (freeze etching)，冰冻断裂与蚀刻复型，主要用来观察膜断裂面的蛋白质颗粒和膜表面结构；④电镜三维重构技术，由电子显微术、电子衍射与计算机图像处理相结合而形成的，具有重要应用前景的一门新技术。电镜三维重构技术与 X-射线晶体衍射技术及核磁共振分析技术相结合，是当前结构生物学 (structural biology) 的主要实验手段。